

Rec'd PHOTO 27 APR 2005

532, 663

10/5326

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
13 mai 2004 (13.05.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/039983 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 15/63

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003188

(22) Date de dépôt international :
27 octobre 2003 (27.10.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0213474 28 octobre 2002 (28.10.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3 Rue Michel-Ange,
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : FUCHS,
Robert, P., P. [FR/FR]; 6A, Rue Prosper Mérimée,
F-67100 Strasbourg (FR). BICHARA, Marc, Bernard
[FR/FR]; 1 Rue Lamartine, F-67550 Vendenheim (FR).

(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc.; Cabinet Harle
et Phelip, 7 rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR INSERTING A NUCLEIC ACID OF INTEREST INTO A PROKARYOTIC OR EUKARYOTIC CELL
BY HOMOLOGOUS RECOMBINATION

(54) Titre : PROCEDE POUR INSERER UN ACIDE NUCLEIQUE D'INTERET DANS UNE CELLULE PROCARYOTE OU
EUCARYOTE PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE

(57) Abstract: The invention concerns the use of a mutagenic agent blocking DNA replication in the cell for inserting *in vitro* a
nucleic acid of interest inside a predetermined nucleotide sequence present in a chromosome contained in a prokaryotic or eukary-
otic cell, said nucleic acid of interest being, prior to its insertion, included in a DNA vector which replicates in said prokaryotic or
eukaryotic host cell.

(57) Abrégé : Utilisation d'un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule pour insérer *in vitro* un acide
nucléique d'intérêt au sein d'une séquence nucléotidique prédéterminée présente dans un chromosome contenu dans une cellule
procaryote ou eucaryote, ledit acide nucléique d'intérêt étant, préalablement à son insertion, inclus dans un vecteur d'ADN qui se
réplique dans ladite cellule hôte procaryote ou eucaryote.

WO 2004/039983 A2

Procédé pour insérer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule procaryote

5 **ou eucaryote par recombinaison homologue**

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine de l'insertion ciblée d'un acide nucléique d'intérêt dans une localisation choisie d'un acide
10 nucléique génomique présent dans un chromosome contenu dans une cellule procaryote ou eucaryote.

ETAT DE LA TECHNIQUE

La mise au point de techniques efficaces et reproductibles en vue
15 de l'insertion ciblée d'un acide nucléique d'intérêt à un endroit choisi de l'ADN d'un chromosome fait actuellement l'objet de nombreux travaux, en particulier de travaux relatifs à la mise au point de techniques de thérapies géniques cellulaires somatiques, qui visent à prévenir ou traiter des pathologies humaines ou animales associées à un déficit d'origine
20 génétique.

Ces techniques sont utiles pour traiter des déficits génétiques provoqués par la mutation du gène sauvage initial. On peut citer par exemple le gène *cfr* dont certaines mutations provoquent la maladie de la mucoviscidose , aussi désignée fibrose kystique.

25 L'insertion ciblée d'un acide nucléique au sein d'un ADN chromosomique est également utile dans le cadre de procédés de production d'animaux transgéniques modèles, notamment afin d'étudier les effets physiologiques de la surexpression (animaux « knock-in ») ou au contraire du blocage de l'expression (animaux « knock-out ») d'un
30 gène d'intérêt, notamment en vue de mettre au point de nouveaux médicaments.

Différentes techniques d'insertion ciblée d'un acide nucléique d'intérêt à un endroit précis et prédéterminé de l'ADN d'un chromosome sont d'ores et déjà disponibles. De nombreuses techniques ont été
35 détaillées notamment dans un article de revue de CAPECCHI (1989).

Par exemple, on a décrit des techniques d'insertion ciblée d'ADN par recombinaison homologue par co-transformation de cellules avec deux vecteurs distincts, respectivement un vecteur contenant un gène de sélection et un vecteur utilisé pour la recombinaison homologue, ces techniques étant utilisées en particulier pour l'interruption d'un gène cible (Reid et al, 1991).

On a aussi décrit des systèmes de recombinaison homologue à deux vecteurs, respectivement (i) un premier vecteur destiné à être intégré dans le génome cible et fournissant un site unique de recombinaison homologue et (ii) un second vecteur comprenant la séquence d'intérêt à insérer au niveau du site unique de recombinaison préalablement intégré (brevet US N° 5,998, 144).

D'autres travaux concernent des systèmes de recombinaison homologue dans lesquels trois partenaires moléculaires, respectivement (i) un fragment d'ADN donneur double brin, (ii) un premier ADN de liaison double-brin et (iii) un second ADN de liaison double brin (brevet américain N° 6,207,442).

L'utilisation de vecteurs rétro-viraux pour réaliser l'insertion ciblée d'ADN par recombinaison homologue a également été décrite (brevet américain N° 6,281,000), ainsi que l'utilisation de vecteurs comprenant deux gènes marqueurs de sélection, respectivement un marqueur de sélection négative et un marqueur de sélection positive (brevet américain N° 6,284,541).

On connaît aussi des techniques de recombinaison homologue qui tirent parti de la formation d'une structure du type triple hélice d'ADN à l'endroit du chromosome préalablement choisi pour l'insertion de l'ADN d'intérêt, comme cela est décrit notamment dans les brevets américains US N° 5,962,426 et US N° 6,303,376.

On a aussi décrit des techniques d'insertion de gènes comportant une étape de transfection des cellules cibles avec un vecteur qui ne se réplique pas dans ces cellules, aussi appelé « vecteur suicide », le vecteur suicide étant au préalable soumis à une exposition au rayonnement ultraviolet (Hinds et al., 1999).

Toutefois, la pratique des techniques de recombinaison homologue ci-dessus, en vue d'insérer de manière ciblée un acide

nucléique dans un chromosome, illustre le fait que les séquences d'ADN d'intérêt exogènes transférées dans des cellules, en particulier des cellules eucaryotes, ne subissent des événements de recombinaison homologue, avec les séquences endogènes homologues de l'hôte cellulaire, qu'à des fréquences très basses de recombinaison, ce qui nécessite le recours à la transfection, puis la sélection, d'un très grand nombre de cellules afin de produire au moins un clone de cellules recombinantes pour lequel la séquence d'ADN d'intérêt a effectivement été insérée à l'endroit choisi du génome.

De plus, pour certaines des techniques ci-dessus, le ou les vecteurs d'ADN utilisés pour réaliser la recombinaison homologue n'est (ne sont) pas éliminé (s) de l'hôte cellulaire, ce qui entraîne de nombreux inconvénients, notamment du fait que ces vecteurs d'ADN comprennent en général des gènes de sélection consistant en des gènes de résistance à divers antibiotiques, susceptibles de diffuser subséquentement dans l'hôte procaryote ou eucaryote recombiné ..

De façon générale, les techniques de ciblage de gènes dans les organismes eucaryotes supérieurs se heurtent au fait que les événements de recombinaison non homologue sont de 1000 à 100 000 fois plus fréquents que les événements de recombinaison homologue. L'absence de technique permettant d'augmenter efficacement la fréquence de recombinaison homologue a orienté les recherches vers le développement de systèmes d'enrichissement en clones recombinants homologues basés sur des sélections génétiques dont l'objet est d'éliminer les clones recombinants chez lesquels se sont réalisés des événements de recombinaison non homologue. Cependant, du fait de la fréquence très faible des événements de recombinaison homologue, et malgré la forte pression de sélection exercée sur les clones cellulaires recombinants, il est souvent très difficile d'obtenir les clones recombinants recherchés, a fortiori de manière reproductible.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

Le demandeur s'est attaché à mettre au point un procédé permettant l'insertion ciblée d'un ADN d'intérêt dans le chromosome d'une cellule, par recombinaison homologue, avec une haute fréquence

des événements de recombinaison homologue, et à l'issue duquel le vecteur porteur de la séquence d'intérêt à insérer de manière ciblée, qui peut comprendre des séquences indésirables tels que des gènes de résistance aux antibiotiques, est éliminé.

5 Il est montré selon l'invention que la mise en contact d'un vecteur d'ADN comprenant un acide nucléique d'intérêt avec un agent mutagène qui crée, dans ledit vecteur d'ADN, des lésions susceptibles d'interférer avec sa réplication dans la cellule, permet l'insertion ciblée, par un événement de recombinaison homologue, de cet acide nucléique
10 d'intérêt dans une localisation choisie dans le génome de ladite cellule, avec une haute fréquence de l'événement de recombinaison homologue.

Simultanément, les parties du vecteur d'ADN, autres que l'acide nucléique d'intérêt qui est initialement inclus dans ce dernier, sont
15 éliminées de la cellule hôte procaryote ou eucaryote recombinée.

Ainsi, selon l'invention, on a montré que l'utilisation d'un vecteur d'ADN comprenant un acide nucléique d'intérêt, ledit vecteur se répliquant dans les cellules procaryotes ou eucaryotes cibles, permet, lorsque ce vecteur d'ADN est traité avec un agent mutagène
20 préalablement à l'étape de transfection dans les cellules, l'obtention d'une haute fréquence d'événements de recombinaison homologues aboutissant à l'insertion ciblée dudit acide nucléique d'intérêt à un endroit choisi du génome cellulaire.

Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, le demandeur
25 pense que la haute fréquence des événements de recombinaison homologue, et donc la haute fréquence d'insertion de l'acide nucléique d'intérêt dans le génome des cellules cibles, est due à la création, au moment de la réplication du vecteur d'ADN dans les cellules transfectées, d'extrémités d'ADN néosynthétisé hautement
30 recombinogènes. Ainsi, grâce au traitement du vecteur d'ADN par l'agent mutagène, la réplication du vecteur dans la cellule est bloquée au niveau des lésions provoquées par cet agent mutagène sur l'ADN du vecteur, ce qui aboutit à la production de fragments d'ADN nouvellement synthétisé dont les extrémités sont capables de se recombinaison avec l'ADN cible

chromosomique, par des événements de recombinaison homologue non réciproque du vecteur vers le chromosome cible dans la cellule.

C'est la raison pour laquelle les agents mutagènes selon l'invention sont choisis parmi les agents qui bloquent la réplication de l'ADN dans la cellule procaryote ou eucaryote et qui créent ainsi des structures recombinogènes au sein de l'ADN traité par lesdits agents mutagènes.

Par structure recombinogène, on entend une ou plusieurs régions de l'ADN traité dans lesquelles la structure double brin de l'ADN est affectée, par exemple par création d'un mésappariement des bases, ce qui inclut une éventuelle coupure de l'un des brins d'ADN. Ces structures recombinogènes d'ADN sont créées lors de l'interruption de la synthèse d'ADN du fait du traitement initial avec l'agent mutagène choisi et incluent de façon non exhaustive des cassures simple brin, des brèches simple brin ainsi que des cassures double brin.

En particulier, il est montré selon l'invention que la mise en contact du vecteur d'ADN comprenant un acide nucléique d'intérêt avec l'agent mutagène N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF) permettait l'insertion ciblée de cet ADN d'intérêt dans une localisation choisie de l'ADN d'un chromosome contenu dans une cellule, par recombinaison homologue non réciproque du vecteur vers le chromosome, avec une haute fréquence d'occurrence de l'événement de recombinaison homologue.

La fixation des molécules de N-AcO-AAF sur le polynucléotide comprenant l'ADN d'intérêt permet l'obtention d'événements de recombinaison homologue non réciproque dans le sens du vecteur d'ADN vers le chromosome, avec une fréquence qui peut être supérieure à 0,05 événements de recombinaison homologue par cellule transfectée.

L'invention a donc pour objet l'utilisation d'un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule pour insérer *in vitro* un acide nucléique d'intérêt au sein d'une séquence nucléotidique prédéterminée présente dans un chromosome contenu dans une cellule procaryote ou eucaryote, ledit acide nucléique d'intérêt étant, préalablement à son insertion, inclus dans un vecteur d'ADN qui se réplique dans ladite cellule hôte procaryote ou eucaryote.

Un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule englobe, selon l'invention, tout composé chimique naturel ou de synthèse, ou encore un rayonnement ultraviolet (UV), dont l'activité de blocage de la réplication de l'ADN peut être déterminée par toute
5 technique connue de l'homme du métier, par exemple la technique décrite par FUCHS (1984), qui utilise l'activité exonucléase 5'→ 3' de l'ADN polymérase du phage T4, laquelle est bloquée au voisinage des bases chimiquement modifiées.

Avantageusement, l'agent mutagène est choisi parmi le N-AcO-AAF, les agents alkylants, le benzo(a)pyrene-diol-époxyde (BPDE), ou
10 encore un rayonnement U.V.

Lorsque l'agent mutagène consiste en un rayonnement UV, l'ADN à traiter est avantageusement irradié par une source de rayons UV immédiatement avant l'utilisation de cet ADN pour transfecter les
15 cellules. Par exemple, l'ADN peut être ajusté à la concentration de 100µg/ml dans un tampon TE (pH 8,0) puis irradié à la température de 20°C-25°C à la puissance de 1,8 J.m⁻².s⁻¹ à l'aide d'une lampe germicide, par exemple la lampe référencée G8T5 (General Electric).

Préférentiellement, l'agent mutagène est le N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF).
20

Le composé N-AcO-AAF est connu dans l'état de la technique en tant qu'agent mutagène. Le composé N-AcO-AAF a notamment été utilisé dans le cadre de travaux académiques relatifs à l'étude du mécanisme de réparation de l'ADN des cellules bactériennes. Lorsque le
25 composé N-AcO-AAF est mis en contact avec un plasmide bactérien qui est subséquentement transfecté dans des cellules d'*Escherichia coli*, on observe une induction des mécanismes intracellulaires de réparation de l'ADN, lesquels par des étapes d'excision puis d'élongation de l'ADN clivé, permettent la survie du plasmide dans les cellules de *E.coli*
30 (Schmid et al., 1982).

Il a aussi été montré que la fréquence de certains événements de recombinaison homologue, du chromosome vers le plasmide, peut être augmentée lorsque le plasmide est préalablement traité avec le N-AcO-AAF, dans un système cellulaire *Escherichia coli*.

Ainsi, Luisi-DeLuca et al. (1984) utilisent un plasmide portant le gène $lacY^+$ dans un hôte bactérien de phénotype $LacY^-$. Après transformation de la cellule bactérienne par le plasmide, la majorité des bactéries transformées sont de phénotypes Lac^- . Les transformants Lac^- obtenus proviennent d'un transfert de l'allèle $lacY^-$ du chromosome vers le plasmide.

10 Maher et al. (1990) avaient aussi montré que le N-AcO-AAF induit des événements de recombinaison homologue intrachromosomique entre des gènes présents dans des cellules de souris, dans le cadre d'une étude académique sur les mécanismes d'induction de cancers par des agents mutagènes.

Il a été montré pour la première fois selon l'invention qu'un agent mutagène tel que défini ci-dessus, en particulier le composé N-AcO-AAF, lorsqu'il est mis en contact avec un vecteur d'ADN réplcatif comprenant un ADN d'intérêt à insérer de manière ciblée dans le chromosome d'une cellule procaryote ou eucaryote, est capable d'induire un transfert de l'ADN d'intérêt dudit vecteur, qui peut être par exemple un plasmide, vers le chromosome, et ceci avec une fréquence très élevée des événements de recombinaison homologue non réciproques du polynucléotide vers le chromosome.

25 L'invention a donc également pour objet un procédé pour insérer *in vitro* un acide nucléique d'intérêt inclus initialement dans un vecteur d'ADN, au sein d'une séquence nucléotidique prédéterminée présente dans un chromosome contenu dans une cellule procaryote ou eucaryote, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) mettre en contact le vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt, et qui se réplique dans ladite cellule procaryote ou eucaryote, avec un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule ;
- 30 b) transfecter des cellules procaryotes ou eucaryotes avec le vecteur d'ADN tel qu'obtenu à la fin de l'étape a) ;
- c) sélectionner les cellules procaryotes ou eucaryotes pour lesquelles l'acide nucléique d'intérêt a été intégré dans la séquence nucléotidique prédéterminée.

De préférence, le procédé ci-dessus comprend en outre l'étape suivante :

d) sélectionner, parmi les cellules procaryotes ou eucaryotes sélectionnées à l'étape c), les cellules dans lesquelles les séquences du vecteur d'ADN, autres que celles de l'acide nucléique d'intérêt, ont été éliminées.

Avantageusement, le composé N-AcO-AAF est préparé par synthèse chimique à partir du Nitrofluorène, selon des techniques connues de l'homme du métier, comme par exemple la technique décrite par LEFEVRE et al. (1978).

Le Nitrofluorène de départ, ainsi que le composé N-AcO-AAF final, peuvent être obtenus notamment auprès de la Société AMERSHAM.

On a montré selon l'invention, que la fréquence des événements de recombinaison homologue non réciproque du vecteur d'ADN, par exemple un plasmide, vers le chromosome, augmente avec un nombre croissant de lésions ou de bases chimiquement modifiées provoquées par l'agent mutagène dans ledit vecteur d'ADN.

Par exemple, on a montré selon l'invention que la fréquence des événements de recombinaison homologue non réciproque du vecteur d'ADN, par exemple un plasmide, vers le chromosome, augmente avec un nombre croissant de molécules d'agent mutagène, comme le N-AcO-AAF, fixés sur ledit vecteur d'ADN.

Ainsi, la fréquence d'évènements de recombinaison homologue passe de $5,61 \times 10^{-4}$ pour dix molécules de N-AcO-AAF par molécule du vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt, à plus de 600×10^{-4} pour 67 molécules de N-AcO-AAF par molécule du vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt.

Des fréquences accrues de recombinaison homologue non réciproque du vecteur d'ADN vers le chromosome peuvent être obtenues avec des rapports encore plus élevés de lésions de l'ADN ou de nombre de molécules d'agent mutagène, comme le N-AcO-AAF, par molécule dudit vecteur.

Ainsi, le nombre de lésions de l'ADN ou de molécules d'agent mutagène par molécule du vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt peut dépasser 100/1.

Avantageusement, à l'étape a) du procédé, la concentration finale de l'agent mutagène utilisé est adaptée à la fixation d'au moins 10 molécules d'agent mutagène par molécule du vecteur d'ADN. Préférentiellement, la concentration finale de l'agent mutagène utilisé est
5 adaptée à la fixation d'au moins 50 molécules de cet agent mutagène par molécule vecteur d'ADN.

Selon l'invention, le nombre de molécules de l'agent mutagène, en particulier de N-Aco-AAF, par molécule du vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt est au minimum de 10/1 et peut aller au-delà
10 de 100/1, par exemple jusqu'à 200/1.

Avantageusement, le nombre de molécules de l'agent mutagène par molécule du vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt est compris entre 10/1 et 100/1, le rapport optimal nombre de molécules de l'agent mutagène/molécule dudit vecteur d'ADN étant choisi en
15 fonction de la fréquence de recombinaison homologue non réciproque du vecteur vers le chromosome désirée.

Afin d'obtenir le rapport molaire désiré agent mutagène/vecteur d'ADN, l'homme du métier peut faire varier (i) les concentrations relatives dudit agent mutagène et dudit vecteur qui sont mis en contact à l'étape
20 a) du procédé et/ou (ii) la durée de l'étape a) de mise en contact dudit agent mutagène avec ledit vecteur.

De préférence, pour un vecteur d'ADN donné, d'une taille donnée, on modifie le rapport molaire agent mutagène/vecteur d'ADN en faisant varier la durée de l'étape a) de mise en contact entre ledit agent
25 mutagène et ledit vecteur.

De même, pour l'obtention d'un rapport molaire agent mutagène/vecteur donné, on fait varier la durée de l'étape a) en fonction de la taille du vecteur d'ADN considéré, la durée de l'étape a) étant d'autant plus longue que la taille du vecteur d'ADN est grande.

30 L'homme du métier peut aisément déterminer si, à la fin de l'étape a) du procédé, le rapport molaire agent mutagène/vecteur d'ADN désiré a été atteint, selon des techniques conventionnelles.

Par exemple, à la fin de l'étape a), une fraction aliquote du mélange agent mutagène/vecteur est prélevée et les molécules libres

d'agent mutagène sont éliminées, par exemple par précipitation de l'ADN puis filtration sur filtre de nitrocellulose.

Puis, on détermine respectivement le nombre de moles du vecteur et le nombre de moles d'agent mutagène fixées sur ledit vecteur afin
5 d'établir le rapport agent mutagène/vecteur qui a été atteint.

Le nombre de moles du vecteur d'ADN contenues dans la fraction aliquote peut être classiquement déterminé par spectrophotométrie UV à la longueur d'onde de 260 nanomètres.

Le nombre de moles de l'agent mutagène fixées sur ce vecteur
10 d'ADN peut être déterminé par mesure de radioactivité, par exemple lorsque, pour les essais, on a utilisé un agent mutagène marqué avec un isotope radioactif, tel que ^3H .

Une molécule d'agent mutagène se fixe sur une base du vecteur. Le résultat peut donc être exprimé en pourcentage de bases du vecteur
15 d'ADN qui ont été modifiées par l'agent mutagène.

Par exemple, on a déterminé selon l'invention, lorsqu'on a traité un vecteur, par exemple un plasmide, d'une longueur de 5000 paires de bases, que les rapports molaires agent mutagène/vecteur étaient respectivement de 13 (0,26% de bases modifiées) pour une durée de
20 l'étape a) de 4 minutes, 28 (0,36% de bases modifiées) pour une durée de 8 minutes, et 56 (1,12% de bases modifiées) pour une durée de 20 minutes, après mise en contact de 60 μg du vecteur d'ADN en solution avec 1,2 μg de N-AcO-AAF.

Pour la mise en œuvre de l'étape a) du procédé, le vecteur
25 comprenant l'acide nucléique d'intérêt est avantageusement en suspension dans un tampon salin, de préférence un tampon citrate, éventuellement additionné d'éthanol.

L'agent mutagène est en solution dans un solvant approprié. Dans le cas du N-AcO-AAF, on utilise de préférence l'éthanol.

Pour un essai donné, l'homme du métier adaptera le rapport
30 molaire agent mutagène/vecteur d'ADN, par de simples essais de routine, jusqu'à l'obtention de la fréquence optimale d'évènements de recombinaison homologe recherchée.

Par « vecteur d'ADN » au sens de la présente invention, on
35 entend une molécule d'ADN circulaire ou linéaire qui est indifféremment

sous la forme simple-brin ou double-brin, et qui se réplique dans la cellule hôte procaryote ou eucaryote dans laquelle ce vecteur d'ADN doit être transfecté.

De préférence, le vecteur d'ADN selon l'invention est un vecteur susceptible d'être répliqué dans un hôte cellulaire choisi, par exemple une cellule bactérienne et encore plus spécifiquement une cellule d'*Escherichia coli*, afin d'en produire de grandes quantités dans les cellules hôtes. Une fois que le vecteur d'ADN est obtenu en une quantité suffisante pour la réalisation de l'étape de transfection dans la cellule hôte choisie, ce vecteur est utilisé comme matériel de départ pour l'insertion ciblée, dans le génome cellulaire, de l'acide nucléique d'intérêt qui est inséré dans celui-ci.

Un vecteur d'ADN pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention comprend, outre l'acide nucléique d'intérêt, également au moins une origine de réplication fonctionnelle dans la cellule hôte dans laquelle il doit être transfecté en vue de l'insertion ciblée, par recombinaison homologue, de l'acide nucléique d'intérêt inséré dans ce vecteur. Un vecteur d'ADN selon l'invention comprend 1, 2, 3, 4 ou 5 origines de réplifications fonctionnelles dans la cellule hôte dans laquelle il doit être transfecté en vue de l'insertion ciblée de l'acide nucléique d'intérêt dans la cellule hôte procaryote ou eucaryote choisie.

Lorsque la cellule hôte à transfecter est une cellule procaryote, par exemple une cellule hôte bactérienne, et encore plus spécifiquement une cellule de *Escherichia coli*, le vecteur d'ADN comprend au moins une origine de réplication fonctionnelle dans cette cellule procaryote, par exemple une origine de réplication fonctionnelle chez *Escherichia coli*.

Lorsque la cellule hôte à transfecter est une cellule eucaryote, par exemple une cellule hôte de mammifère, et encore plus spécifiquement une cellule humaine, le vecteur d'ADN comprend au moins une origine de réplication fonctionnelle dans cette cellule eucaryote, par exemple une origine de réplication fonctionnelle dans des cellules humaines.

Avantageusement, un tel vecteur comprend aussi la séquence d'un gène marqueur, par exemple un gène de résistance aux antibiotiques, permettant la sélection des cellules hôtes, notamment des cellules hôtes de *E.coli*, qui ont été transfectées avec ledit vecteur, ces

cellules transfectées permettent, par leur culture dans un milieu de culture approprié, l'obtention de grandes quantités du vecteur.

Avantageusement, un tel vecteur comprend aussi la séquence d'un gène marqueur fonctionnel dans la cellule hôte dans laquelle on
5 recherche l'insertion de l'acide nucléique d'intérêt par recombinaison homologue, la détection de l'expression dudit gène marqueur permettant la sélection positive ou négative des cellules hôtes ayant été effectivement transfectées avec ce vecteur.

Une première illustration préférée d'un vecteur constituant le
10 vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt utilisé selon l'invention est le vecteur pCUL-lacZ :kan dont le procédé de construction est décrit dans les exemples.

Une seconde illustration préférée d'un vecteur constituant le
15 vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt utilisé selon l'invention est le vecteur pGT-rev1 dont le procédé de construction est décrit dans les exemples.

On peut aussi avoir recours à des vecteurs capables d'inclure de grandes séquences d'insertion. Dans ce mode de réalisation particulier, on utilisera de préférence des vecteurs de bactériophage, tels que les
20 vecteurs de bactériophage P1, comme le vecteur p158, ou encore le vecteur p158/neo8 décrits par Sternberg (1992, 1994).

Les vecteurs bactériens préférés selon l'invention sont par exemple les vecteurs pBR322(ATCC37017) ou encore des vecteurs tels que pAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suède), et pGEM1 (Promega
25 Biotech, Madison, WI, ETATS-UNIS).

On peut encore citer d'autres vecteurs commercialisés tels que les vecteurs pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen), psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG(Stratagene).

30 Il peut s'agir aussi du vecteur recombinant PXP1 décrit par Nordeen SK et al. (1988).

Il peut encore s'agir de vecteurs adénoviraux tels que l'adénovirus humain de type 2 ou 5.

Un vecteur recombinant selon l'invention peut aussi être un
35 vecteur rétroviral ou encore un vecteur adéno-associé (AAV). De tels

vecteurs adéno-associés sont par exemple décrits par Flotte et al. (1992), Samulski et al. (1989), ou encore McLaughlin BA et al. (1996).

Selon un autre mode de réalisation du polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt, le vecteur d'ADN est un ADN linéaire double
5 brin.

De manière surprenante, on a montré que le procédé selon l'invention permettait l'insertion ciblée d'acides nucléiques de grande taille, supérieure à 1,5 kilobases. Cette caractéristique du procédé de l'invention est particulièrement avantageuse, car elle permet notamment
10 l'insertion ciblée de séquences génomiques de gènes entiers, avec toutes les séquences fonctionnelles présentes dans les introns des gènes, qui ne sont pas retrouvées par exemple dans l'ADNc correspondant.

De manière générale, l'acide nucléique d'intérêt à insérer dans le
15 génome de la cellule procaryote ou eucaryote inclus dans le vecteur d'ADN comprend au moins, respectivement à son extrémité 5' et à son extrémité 3', des séquences nucléotidiques ayant un haut degré d'identité, de préférence supérieur à 99,5%, et encore mieux supérieur à 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% d'identité, sans lacune ou « gap », avec les
20 séquences correspondantes de l'ADN cible contenu dans le chromosome. De préférence, ces séquences localisées respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'acide nucléique d'intérêt sont identiques aux séquences des extrémités respectivement 5' et 3' de la séquence cible visée qui est présente dans le chromosome, afin d'accroître encore la
25 fréquence des événements de recombinaison homologue. Les séquences flanquantes localisées respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'acide nucléique d'intérêt inclus dans le vecteur utilisé pour la transfection comprennent au moins 100 paires de base, de préférence au moins 300 paires de base successives identiques aux séquences
30 cibles correspondantes dans le chromosome. Plus la taille des séquences flanquantes 5' et 3' est grande et plus la probabilité d'obtention d'une haute fréquence de recombinaison homologue est élevée. De manière générale, on préfère des séquences flanquantes

ayant de 300 à 1500 paires de bases identiques avec les séquences cibles correspondantes natives dans le chromosome.

Des séquences flanquantes homologues d'une longueur supérieure à 1500 paires de bases peuvent aussi être utilisées.

5 Selon un mode de réalisation tout à fait préféré du procédé, l'acide nucléique d'intérêt à insérer dans le génome, qui est inclus dans le vecteur d'ADN, comprend une séquence marqueur de sélection. Préférentiellement, la séquence nucléotidique marqueur de sélection
10 hôte procaryote ou eucaryote après l'insertion ciblée, par recombinaison homologue, dudit acide nucléique d'intérêt à l'endroit choisi du génome. Avantageusement, le gène marqueur de sélection est choisi parmi :

15 a) les gènes marqueurs de sélection fonctionnels chez *E. coli*, tels que les gènes de résistance à l'ampicilline, la tétracycline, la kanamycine, le chloramphénicol ;

 b) les gènes marqueurs fonctionnels dans les cellules de mammifères, tels que les gènes de résistance à la néomycine ou à la zéocine.

20 c) les gènes marqueurs codant une protéine fluorescente telle qu'une GFP (« Green Fluorescent Protein ») ou YFP (« Yellow Fluorescent Protein »).

 Pour choisir un gène marqueur de sélection approprié, l'homme du métier se référera avantageusement à l'ouvrage de Sambrook et al. (2001).

25 Le gène marqueur de sélection inclus dans l'acide nucléique d'intérêt permet ainsi aisément de réaliser l'étape c) de sélection du procédé selon l'invention.

 En effet, la séquence marqueur de sélection incluse dans l'acide nucléique d'intérêt rend aisée la sélection des clones de cellules
30 procaryotes ou eucaryotes initialement transfectées avec le vecteur d'ADN comprenant ledit acide nucléique d'intérêt, lesquelles cellules ont intégré, par recombinaison homologue, ledit acide nucléique d'intérêt, dans la localisation choisie de leur génome. L'événement de recombinaison homologue non réciproque du vecteur vers le
35 chromosome peut ainsi être détecté par l'observation du phénotype des

cellules procaryotes ou eucaryotes recombinaées, ledit phénotype étant conféré par l'expression du gène marqueur, par exemple pour la production d'une protéine marqueur codée par le gène marqueur. La protéine marqueur peut être une protéine de résistance à un antibiotique ou encore une protéine fluorescente.

Selon un premier aspect préféré, l'acide nucléique d'intérêt qui est contenu dans le vecteur comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine d'intérêt thérapeutique. La protéine d'intérêt thérapeutique peut être de toute nature. Il peut s'agir par exemple d'une protéine choisie parmi les cytokines, les hormones ou encore les facteurs de croissance.

Parmi les cytokines, on peut citer notamment les Interleukines, tels que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL6, l'IL-10 ou l'IL-12, ou encore d'autres facteurs cytokiniques tels que MG-CSF.

Parmi les hormones, on peut citer notamment la LHRH. Parmi les facteurs de croissance, on peut citer notamment l'hormone de croissance humaine.

La protéine d'intérêt thérapeutique peut également être une protéine ou un peptide antigénique susceptible, lorsqu'il est présenté aux cellules du système immunitaire, d'induire la production d'anticorps à l'encontre d'un antigène, par exemple un antigène dérivé d'une bactérie ou d'un virus pathogène, ou encore induire la production de lymphocytes T-cytotoxiques spécifiques d'un antigène dérivé d'un organisme pathogène, tel qu'un rétrovirus comme le VIH-1 ou le VIH-2 ou le virus de l'hépatite virale, ou encore de lymphocytes T-cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux.

De préférence, selon ce premier aspect préféré de l'acide nucléique d'intérêt, le cadre de lecture ouvert code pour une protéine d'intérêt thérapeutique dont une surexpression est recherchée dans la cellule hôte.

Selon un second aspect préféré, l'acide nucléique d'intérêt comprend un cadre de lecture ouvert interrompu par une séquence nucléotidique hétérologue. Ce second aspect préféré de l'invention est mis en œuvre principalement lorsque l'insertion ciblée de l'acide nucléique d'intérêt vise à remplacer, dans le chromosome cellulaire, au moins une partie de la séquence d'un gène par ledit acide nucléique

d'intérêt, afin d'interrompre la séquence sauvage native dudit gène dans le chromosome et bloquer ainsi son expression. Un tel acide nucléique comprend au moins, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', (i) une première séquence nucléotidique identique à une séquence du gène cible présente dans le chromosome, (ii) la séquence nucléotidique hétérologue et (iii) une seconde séquence nucléotidique identique à une seconde séquence du gène cible dans le chromosome. Les séquences nucléotidiques (i) et (ii), du fait qu'elles sont identiques à des séquences correspondantes dans le chromosome, permettent de cibler l'insertion de l'acide nucléique d'intérêt dans ledit gène.

Selon l'invention, la séquence nucléotidique hétérologue (ii) consiste en une séquence nucléotidique qui n'est pas naturellement présente dans l'ADN cible visé.

On utilisera en particulier ce second aspect préféré de l'acide nucléique d'intérêt de l'invention pour transfecter des cellules souches embryonnaires de mammifères non humains, dans un procédé de production d'animaux transgéniques dans lesquels le gène cible est interrompu et bloqué dans son expression (animaux knock-out).

Selon ce second aspect préféré, la séquence nucléotidique hétérologue (ii) peut être le gène marqueur défini précédemment, tel qu'un gène codant pour une protéine de résistance aux antibiotiques ou encore une toute autre protéine détectable, telle qu'une protéine fluorescente comme la GFP (« Green fluorescent protein ») ou encore YFP (« Yellow fluorescent protein »), bien connues de l'homme du métier.

Selon un troisième aspect préféré, l'acide nucléique d'intérêt code pour un ARN antisens. On mettra en œuvre ce troisième aspect préféré de l'acide nucléique d'intérêt lorsque l'objectif recherché est d'inhiber l'expression d'une protéine codée par un gène cible, l'ARN antisens ainsi produit hybridant spécifiquement avec l'ARN messenger constituant le produit de transcription du gène dont l'inhibition de l'expression est recherchée.

Selon un quatrième aspect préféré, le procédé selon l'invention est utilisé pour introduire une ou plusieurs mutations dans une séquence génomique d'une cellule procaryote ou eucaryote, par exemple une ou

plusieurs mutations ponctuelles correspondant chacune à la substitution d'une base dans la séquence génomique ciblée initiale de la cellule procaryote ou eucaryote. Selon ce quatrième aspect préféré, l'acide nucléique d'intérêt inclus dans le vecteur d'ADN possède une séquence
5 nucléotidique identique à celle de la séquence génomique ciblée, à l'exception de la ou des bases substituées.

De préférence, selon ce quatrième aspect préféré, les bases hétérologues par rapport à la séquence cible du génome cellulaire, qui sont incluses dans l'acide nucléique d'intérêt, sont avantageusement
10 localisées à proximité de la séquence marqueur de sélection également incluse dans l'acide nucléique d'intérêt.

De manière tout à fait préférée, l'acide nucléique d'intérêt comprend, selon ce quatrième mode de réalisation, de 1 à 10 bases substituées, distinctes des bases correspondantes de l'ADN cible visé.

15 Ce quatrième mode de réalisation préféré est appliqué notamment pour corriger ou au contraire introduire des mutations spécifiques, de manière ciblée, dans des localisations prédéterminées du génome cellulaire, par exemple dans des procédés d'obtention d'animaux transgéniques de type « knock-in ».

20 Préférentiellement, l'acide nucléique d'intérêt inclus dans le vecteur d'ADN comprend de plus une séquence nucléotidique à fonction de promoteur, fonctionnelle dans la cellule hôte procaryote ou eucaryote choisie, sous le contrôle de laquelle est placé le cadre de lecture ouvert ou la séquence codant l'ARN antisens. Le type de promoteur sera choisi
25 parmi les promoteurs connus, en fonction du type de cellules hôtes choisies, procaryotes ou eucaryotes.

A titre d'exemples, les promoteurs bactériens pourront être les promoteurs LacI, LacZ, les promoteurs de l'ARN polymérase du bactériophage T3 ou T7, les promoteurs PR, ou PL du phage lambda.

30 Les promoteurs pour cellules eucaryotes comprendront le promoteur de la thymidine kinase du virus HSV ou encore le promoteur de la métallothionéine-L de souris.

De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de

Sambrook et al. (1989) ou encore aux techniques décrites par Fuller et al. (1996).

Selon encore un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt qui est utilisé pour transfecter les cellules eucaryotes ou procaryotes, comprend une séquence nucléotidique marqueur, notamment un gène marqueur, par exemple une séquence nucléotidique codant une protéine marqueur, ladite séquence nucléotidique étant localisée, dans ledit vecteur, en dehors de la séquence nucléotidique de l'acide nucléique d'intérêt. Ce gène marqueur permet aisément la réalisation de l'étape d) de sélection du procédé selon l'invention. Selon ce mode de réalisation préféré de l'invention, l'expression de la protéine marqueur codée par la séquence nucléotidique localisée en dehors de la séquence de l'acide nucléique d'intérêt permet de sélectionner les cellules hôtes procaryotes ou eucaryotes qui ont été efficacement transfectées par ledit vecteur d'ADN, par exemple un plasmide ou tout autre vecteur d'ADN, mais pour lesquels l'événement de recombinaison homologue n'a pas eu lieu avec élimination des séquences nucléotidiques du vecteur, autres que celle de l'acide nucléique d'intérêt, par exemple avec élimination des séquences du vecteur autres que celles de l'acide nucléique d'intérêt à insérer.

L'introduction du vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt selon l'invention dans une cellule est réalisée *in vitro*, selon les techniques bien connues de l'homme du métier pour transformer ou transfecter des cellules, soit en culture primaire, soit sous la forme de lignées cellulaires.

Pour introduire les vecteurs dans une cellule hôte, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à différentes techniques, comme la technique de précipitation au phosphate de calcium (Graham et al., 1973 ; Chen et al., 1987), le DEAE Dextran (Gopal, 1985), l'électroporation (Tur-Kaspa, 1896), la microinjection directe (Harland et al., 1985), ou encore les liposomes chargés en ADN (Nicolau et al., 1982, Fraley et al., 1979).

Le procédé selon l'invention trouve une application préférée pour l'insertion ciblée de l'acide nucléique d'intérêt dans une cellule

bactérienne ou dans une cellule de mammifère, humaine ou non-humaine.

Lorsque le procédé selon l'invention est mis en œuvre pour l'insertion ciblée d'un acide nucléique d'intérêt dans le génome d'une
5 cellule de mammifère, en particulier dans une localisation prédéterminée du génome d'une cellule humaine, il s'intègre en tant qu'étape particulière de réalisation d'un procédé de thérapie génique des cellules somatiques.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une
10 anomalie (mutation, expression aberrante, etc) ou à assurer l'expression d'une protéine d'intérêt thérapeutique par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit *ex vivo* dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit
15 directement *in vivo* dans le tissu approprié. Dans ce second cas, différentes techniques existent, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., 1967), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al, 1989), d'ADN et de lipides (Felgner et al, 1987), l'emploi de liposomes
20 (Fraley et al., 1980), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.
25

Selon encore un autre aspect préféré, les cellules transférées à l'étape b) du procédé de l'invention consistent en des cellules bactériennes, telles que *E. coli*.

Selon un autre aspect préféré, les cellules transfectées à l'étape
30 b) du procédé de l'invention consistent en des cellules de mammifères non humains, telles que des cellules de souris ou de lapins, y compris les cellules souches embryonnaires de la lignée ES, ou encore des cellules de rats, de cobayes, de chiens ou de singes.

Selon un dernier aspect préféré de l'invention, les cellules transfectées à l'étape b) du procédé consistent en des cellules humaines, comme par exemple des cellules épithéliales, des cellules musculaires, des monocytes/macrophages ou encore des lymphocytes.

5

La présente invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, à la figure unique et aux exemples suivants.

La figure 1 illustre le schéma expérimental d'insertion d'un acide nucléique d'intérêt contenant le gène LacZ interrompu par un gène marqueur de résistance à la kanamycine dans le génome d'une cellule de *Escherichia coli*.

La figure 2 illustre le schéma expérimental de construction d'un vecteur d'ADN pour l'insertion ciblée d'un acide nucléique d'intérêt dans des cellules humaines, le vecteur pGT-Rev1. Dans le vecteur pGT-Rev1, l'acide nucléique d'intérêt est l'acide nucléique Rev1 codant pour une polymérase humaine, dont la séquence est interrompue par un gène marqueur, ici le gène de résistance à la Zéocine ou le gène de résistance à la Blasticidine.

La Figure 3 illustre le schéma de transfection *in vitro* de cellules humaines avec le vecteur pGT-Rev1, en vue d'insérer dans le chromosome une copie non fonctionnelle du gène Rev1, interrompue par le gène marqueur.

EXEMPLES

25

EXEMPLE 1 : Construction du vecteur pCUL-lacZ ::kan

Le plasmide pCUL-LacZ ::kan a été construit à partir d'un dérivé du vecteur bien connu pUC8 (décrit par YANNISCH-PERRON et al., 1985) dans lequel l'origine de réplication ainsi que le gène LacZ' ont été retournés (vecteur pCUL-, cf Schumacher et al. 1998). Le gène LacZ a été obtenu par traitement d'un dérivé du plasmide pBR329 contenant le gène LacZ à l'aide des endonucléases de restriction EcoRI « fill-in » et FspI. Le fragment de 3000 bp ainsi obtenu a ensuite été cloné dans les sites SapI (filled in) in FspI du vecteur pCUL-. Le plasmide résultant (pCUL-LacZ) contient l'origine de réplication Co1EI, le marqueur de

35

résistance à l'ampicilline ainsi que le gène lacZ en entier. Le gène de
résistance à la Kanamycine, cloné par PCR à partir du vecteur pUC4k
(Pharmacia) a été ensuite inséré au site EcoRV du plasmide pCUL-LacZ
pour donner naissance au plasmide pCUL-LacZ ::kan utilisé dans la suite
5 des expériences.

**EXEMPLE 2 : Insertion ciblée, par recombinaison homologue, d'un
acide nucléique d'intérêt dans un génome cellulaire procaryote**

10 **A. Matériel et Méthodes.**

A.1 Traitement du vecteur par le N-AcO-AAF.

Mélange réactionnel :

- ADN plasmidique : concentration finale de 0,5µg/µl dans du tampon
15 citrate 2×10^{-3} M, pH7.
- N-AcO-AAF : concentration finale de 400µg/ml dans de l'éthanol.
On ajoute 60 µg d'ADN dans 114 µl de tampon citrate 2×10^{-3} M
pH7, additionnée de 3 µl d'éthanol à 100% ;
On préchauffe la solution à 37°C ;
20 puis on ajoute 3 µl de N-AcO-AAF (400 µg/ml) marqué au tritium
(^3H).

Temps de réaction : 4, 8, 20 minutes.

On prélève 40 µl aux différents temps choisis. On arrête la
réaction par une étape de précipitation de l'ADN avec 3 volumes
25 d'éthanol/acétate de sodium à 0,16 M suivi de trois autres étapes de
précipitation dans les mêmes conditions.

On détermine le pourcentage de bases modifiées en mesurant le
nombre de moles de plasmide par spectrophotométrie UV et le nombre
de moles d'AAF fixé, par comptage de la radioactivité β.

30 Le résultat est exprimé en pourcentage de bases modifié. Le
temps de réaction est adapté en fonction de la taille du plasmide et du
pourcentage de bases modifié souhaité.

A.2. Réalisation de la transfection des cellules de *E.coli*

Les cellules de *E.coli* sont transformées selon le procédé
35 conventionnel d'électroporation en utilisant les conditions préconisées

par les constructeurs des appareils prévu pour cet effet (Gene Pulser de Biorad par exemple).

A.3. Sélection des clones cellulaires recombinants

Dans l'exemple, les clones transformants sont sélectionnés sur milieu LB-agar contenant de la Kanamycine (20µg/ml) et l'absence d'activité β -galactosidase (se traduisant par des colonies blanches au lieu de bleues), phénotype caractéristique d'un événement de recombinaison non réciproque est visualisé grâce à la présence de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) et d'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) dans les boîtes.

B. RESULTATS

Les résultats sont représentés dans le tableau 1 ci-après.

TABLEAU 1

Nombre de lésions par plasmide	Fréquence de recombinaison : colonies blanches/colonies totales
OAAF	<0.0096 ^a 10426/0 ^b
10AA2F	0.056 17819/10
20AAF	0.17 9692/17
33AAF	0.32 2301975
43AAF	1.41 16554/237
67AAF	6.07 1934/125

^a fréquence de recombinaison homologue

^b nombre total de colonies/nombre de colonies recombinées.

Les résultats présentés dans le Tableau 1 ci-dessus montrent clairement que la fréquence de recombinaison homologue ciblée augmente en fonction du nombre de lésions produites par la modification chimique du plasmide (tableau 1). Ainsi, dans une souche sauvage pour les systèmes de recombinaison, alors que les événements spontanés de recombinaison homologue représentent moins de 0,03% des événements de transformation, la présence de 67 lésions AAF sur ce plasmide conduit à l'obtention de plus de 6% de molécules

recombinantes ciblées, soit une augmentation de plus de 1700 fois de la fréquence de recombinaison.

De plus, on a mis en évidence qu'avec le procédé de l'invention, le mécanisme conduisant au ciblage du gène est un mécanisme de recombinaison homologue non réciproque au cours duquel la molécule plasmidique est perdue. Ceci permet de réaliser un ciblage de gène très efficace en une seule étape. Chez *E. coli*, ce procédé a été utilisé pour construire plus de dix souches dans lesquelles différents gènes ont été interrompus.

Ainsi, par exemple, ont été construites des souches dans lesquelles certains gènes impliqués dans la recombinaison (*recF*, *recG*, *dinG*), ont été interrompus par des gènes codant pour la résistance à des antibiotiques comme la tétracycline ou le chloramphénicol. Ce ciblage de gène a été réalisé dans différents fonds génétiques comme par exemple dans des souches dont le système de réparation par excision (*uvrABC* dépendant) était inactivé.

EXEMPLE 2 : Insertion ciblée, par recombinaison homologue, d'un acide nucléique d'intérêt dans un génome cellulaire eucaryote humain

A. Construction du vecteur pGT-Rev1

On a construit le vecteur pGT-Rev1 destiné à être utilisé dans le procédé selon l'invention, en vue d'insérer une copie non fonctionnelle du gène *Rev1* dans le génome d'une cellule humaine, en remplacement de la copie du gène *Rev1* natif.

Le vecteur pGT-Rev1 comprend une origine de réplication fonctionnelle chez *E. coli*, ici l'origine ColE1, ce qui permet, après transfection de cellules de *E. coli* avec ce vecteur, l'obtention de quantités suffisantes du vecteur pour transfecter ensuite les cellules humaines cibles, en vue d'insérer le gène *Rev1* interrompu par le gène marqueur, à la place du gène *Rev1* natif. Pour vérifier le succès de la transfection chez *E. coli*, le vecteur pGT-Rev1 comprend un gène marqueur de sélection qui est fonctionnel chez les bactéries, le gène de résistance à l'ampicilline.

Le vecteur pGT-Rev1 comprend une origine de réplication fonctionnelle dans les cellules humaines, ici l'origine de réplication oriP du virus d'Epstein-Barr, qui permet au vecteur de se répliquer un nombre limité de fois dans les cellules humaines. Pour vérifier le succès de la transfection dans les cellules humaines, le vecteur PGT-REV1 comprend un gène marqueur de transfection qui est fonctionnel chez l'homme, le gène eGFP codant la « Green Fluorescent Protein ».

Les différentes étapes du protocole de construction du vecteur pGT est décrit sur le schéma de la figure 2. Il apparaîtra clairement à l'homme du métier que l'acide nucléique d'intérêt est inséré dans le vecteur pGT décrit dans la figure 2, pour obtenir le vecteur d'ADN utilisé dans le procédé selon l'invention. Notamment, la figure 3 illustre le vecteur PGT-Rev1, qui est le vecteur pGT dans lequel on a inséré, en tant qu'acide nucléique d'intérêt, le gène humain Rev1 dont la séquence nucléotidique a été interrompue par un gène marqueur.

Comme illustré sur la Figure 2, pour réaliser le vecteur pGT, on a utilisé les oligonucléotides suivants :

a) Etape 1 :

oligo 1 : GGTACAACCTGCCAACTGGG (SEQ ID N°1) ;

oligo 2 : TTGTCACGTCACTCAGCTCC (SEQ ID N°2) ;

b) Etape 2 :

GCCGGCCACGTGATTAAATACGT (SEQ ID N°3) ;

c) Etape 3 :

oligo 1 : CTTTCCTGCGTTATCCCCTG (SEQ ID N°4) ;

oligo 2 : TCGCCCTTTGACGTTGGAGT (SEQ ID N°5) ;

d) Etape 4 :

oligo 1 : AGCACTTCCACCTGATCTCC (SEQ ID N°6) ;

oligo 2 : GCTCCTGTGTTCTTCATGCTTGG (SEQ ID N°7) ;

e) Etape 5 :

oligo 1 : GCTGGCCTTTTGCTCACATG (SEQ ID N°8) ;

oligo 2 : AAAGGGGGATGTGCTGCAAG (SEQ ID N°9).

En utilisant le principe développé chez *E. coli*, on a adapté l'outil décrit dans les exemples précédents, pour la transfection des cellules
5 humaines en culture.

Pour cela on a développé un vecteur dont les caractéristiques sont les suivantes : i) il est capable de se répliquer dans la bactérie de telle sorte que l'on puisse produire suffisamment de plasmide pour le modifier chimiquement ; ii) il est également capable de se répliquer dans les
10 cellules humaines afin de générer des extrémités recombinogènes par blocage de la réplication au niveau des lésions. Par conséquent, l'ossature de ce vecteur contient les éléments suivants :

- Origine de réplication fonctionnant chez *E. coli* (ColE1, grand nombre de copies).
- 15 - Marqueur de sélection bactérien : résistance à l'ampicilline
- Origine de réplication du virus Epstein-Barr (oriP) lui permettant de se répliquer un nombre limité de fois dans des cellules humaines.
- Marqueur de transfection: Green Fluorescent Protein (eGFP).

20

B. Ciblage du gène *REV1* humain

Le produit du gène *REV1* fait partie d'une nouvelle classe de polymérases spécialisées (dont font partie également les ADN
25 polymérases η (Pol η), ι (Pol ι) et κ (Pol κ)) qui ont pour caractéristique la structure particulière de leur site actif leur permettant de tolérer et de répliquer l'ADN contenant des lésions ou des distorsions. Il a été montré récemment dans notre laboratoire, que la protéine codée par le gène *REV1* et l'ADN polymérase η interagissent et la région de cette
30 interaction sur la protéine Rev1 a été mappée. Pol η joue un rôle primordial dans la cellule car elle est capable de franchir très

efficacement et sans erreur un dimère de pyrimidine T-T de type cyclobutane (lésion majoritairement formée après irradiation des cellules aux rayonnements ultraviolets). L'absence de cette polymérase est à l'origine de la maladie *Xeroderma pigmentosum* variant (XPV) et entraîne
5 l'hypermutabilité des cellules après irradiation aux UV et l'apparition de cancers cutanés

Si l'interaction entre Rev1 et Pol η est avérée, son rôle physiologique reste inconnu et posséder un mutant de Rev1 n'interagissant plus avec Pol η permettrait bien évidemment de comprendre l'importance de cette
10 interaction.

Le demandeur a ciblé le site d'interaction porté par Rev1, en utilisant la stratégie suivante :

- a) Amplification par PCR du fragment chromosomique contenant l'exon 23 du gène *REV1*, issu soit de cellules 1BR (fibroblastes
15 primaires) soit de cellules HeLa (cellules humaines transformées) ; séquençage du produit PCR et clonage dans les plasmides « ad hoc » de façon à disposer des deux allèles sur plasmide;
- b) Interruption de l'exon 23 de chaque allèle cloné par un gène codant pour la résistance à un antibiotique (blastidicine ou zéocine) ;
- 20 c) Modification des plasmides ainsi obtenus par le N-Aco-AAF ; et
- d) Transfection dans les cellules humaines (1Br ou Hela) en culture et sélection pour la résistance à l'antibiotique de choix.

RESULTATS

25 Une série d'expériences a été réalisée : les plasmides contenant le fragment du gène *REV1* issu de fibroblastes primaires (1BR) ont été produits en quantité, et traités avec le N-Aco-AAF. Les plasmides traités ont ensuite été utilisés pour transfecter des cellules de fibroblastes humains en culture primaire.

30 L'analyse de la fluorescence induite par la GFP montre que de nombreuses cellules ont été transfectées.

L'application de la sélection par les antibiotiques a permis d'obtenir des clones recombinants.

REFERENCES

- Cappecchi**, 1989, *Science*, vol. 244 : 1288
- Chen et al.**, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7 : 2745-2752.
- Fraley et al.**, *J.Biol.Chem.* 255 (1980) 10431
- 5 **Flotte et al.**, 1992, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7 : 349-356.
- Fuchs R.P.P. J.**, 1984, *Mol. Biol.*, 177(1): 173:180.
- Felgner et al.**, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 7413
- Fuller S.A. et al.**, 1996, *Immunology in Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al.
- 10 **Graham et al.**, 1973, *Virology*, 52 : 456-457.
- Gopal**, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5 : 1188-1190.
- Harland et al.**, 1985, *J. Cell. Biol.*, 101 : 1094-1095.
- Hinds et al.**, 1999, *Microbiology*, 154, 519-527.
- Kaneda et al.**, 1989, *Science* 243 : 375
- 15 **Lefèvre et al.**, 1978, *Biochemistry*, vol.17 : 2561-2567.
- Luisi-De-Luca C**, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.81 :2831-2835
- Maher et al.**, 1990, *Environmental Science Research*, 149-156
- McLaughlin BA et al.**, 1996, *Am. J. Hum. Genet.*, 59 : 561-569.
- Nicolau C. et al.**, 1987, *Methods Enzymol.*, 149:157-76.
- 20 **Nordeen SK et al.**, 1988, *BioTechniques*, 6 : 454-457
- Pagano et al.**, 1967, *J.Virol.* 1 : 891
- Reid et al.** , 1991, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 11: 2769
- Samulski et al.**, 1989, *J. Virol.*, 63 : 3822-3828.
- Sambrook, J. Fritsch, E. F., and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York.
- 25 **Sternberg N.L.**, 1992, *Trends Genet.*, 8 : 1-16.
- Sternberg N.L.**, 1994, *Mamm. Genome*, 5 : 397-404.
- Schmid S E**, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.79:4133(4137).

Sambrook et Russel, Molecular Cloning, 2001, 3^{ème} édition, CSHL Press.

Schumacher et al., 1998 [Référence à compléter S.V.P.].

Tur-Kaspa et al, 1986, Mol. Cell. Biol., 6 : 716-718.

- 5 **Yannisch-Perron C. et al.**, 1985, Gene, 33:103-119.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule pour insérer *in vitro* un acide nucléique d'intérêt au sein d'une séquence nucléotidique prédéterminée présente dans un chromosome contenu dans une cellule procaryote ou eucaryote, ledit acide nucléique d'intérêt étant, préalablement à son insertion, inclus dans un vecteur d'ADN qui se réplique dans ladite cellule hôte procaryote ou eucaryote.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'agent mutagène est choisi parmi le N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF), un agent alkylant, le benzo(a) pyrene-diol-époxyde (BPDE) ou encore un rayonnement UV.
3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'agent mutagène est le N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF).
4. Procédé pour insérer *in vitro* un acide nucléique d'intérêt inclus initialement dans un vecteur d'ADN, au sein d'une séquence nucléotidique prédéterminée présente dans un chromosome contenu dans une cellule procaryote ou eucaryote, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :
- a) mettre en contact le vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt, et qui se réplique dans ladite cellule procaryote ou eucaryote, avec un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule ;
 - b) transfecter des cellules procaryotes ou eucaryotes avec le vecteur d'ADN tel qu'obtenu à la fin de l'étape a) ;
 - c) sélectionner les cellules procaryotes ou eucaryotes pour lesquelles l'acide nucléique d'intérêt a été intégré dans la séquence nucléotidique prédéterminée.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape suivante :
- d) sélectionner parmi les cellules procaryotes ou eucaryotes sélectionnées à l'étape c), les cellules dans lesquelles les séquences du vecteur d'ADN, autres que celle de l'acide nucléique d'intérêt, ont été éliminées.

6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent mutagène est choisi parmi le N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF), un agent alkylant, le benzo(a) pyrene-diol-époxyde (BPDE) ou encore un rayonnement UV.

5 7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'agent mutagène est le N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF).

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'à l'étape a), le N-AcO-AAF est mis en contact avec le vecteur d'ADN comprenant l'acide nucléique d'intérêt, à une concentration adaptée à la fixation d'au
10 moins 10 molécules de N-AcO-AAF par molécule du polynucléotide.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la concentration de N-AcO-AAF est adaptée à la fixation d'au moins 50 molécules de N-AcO-AAF par molécule du polynucléotide.

10. Procédé selon l'une des revendications 4 à 9, caractérisé en
15 ce que l'acide nucléique d'intérêt à insérer dans le génome de la cellule procaryote ou eucaryote, qui est inclus initialement dans ledit vecteur d'ADN, comprend respectivement, à son extrémité 5' et à son extrémité 3', des séquences ayant un haut degré d'identité avec les séquences correspondantes localisées aux extrémités 5' et 3' de l'ADN cible
20 contenu dans le chromosome.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les séquences localisées respectivement à l'extrémité 5' et à l'extrémité 3' de l'acide nucléique d'intérêt sont identiques aux extrémités respectivement 5' et 3' de l'ADN cible contenu dans le chromosome.

25 12. Procédé selon l'une des revendications 4 à 11, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt inclus dans ledit vecteur d'ADN comprend une séquence nucléotidique marqueur de sélection.

13. Procédé selon l'une des revendications 4 à 12, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt comprend un cadre de lecture ouvert
30 codant une protéine d'intérêt thérapeutique.

14. Procédé selon l'une des revendications 4 à 12, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt comprend un cadre de lecture ouvert interrompu par une séquence nucléotidique hétérologue.

15. Procédé selon l'une des revendications 4 à 13, caractérisé en
35 ce que l'acide nucléique d'intérêt code pour un ARN antisens.

16. Procédé selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt comprend de plus une séquence nucléotidique à fonction de promoteur, fonctionnelle dans la cellule hôte procaryote ou eucaryote choisie, sous le contrôle de laquelle est placé le
5 cadre de lecture ouvert ou la séquence codant l'ARN incluse dans ledit acide nucléique d'intérêt.

17. Procédé selon l'une des revendications 4 à 16, caractérisé en ce que le polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt comprend une séquence nucléotidique marqueur localisée, dans ledit
10 polynucléotide, en dehors de la séquence nucléotidique de l'acide nucléique d'intérêt.

18. Procédé selon l'une des revendications 4 à 17, caractérisé en ce que le vecteur d'ADN est un plasmide bactérien.

19. Procédé selon l'une des revendications 4 à 18, caractérisé en
15 ce que le vecteur d'ADN est un plasmide fonctionnel dans des cellules bactériennes.

20. Procédé selon l'une des revendications 4 à 18, caractérisé en ce que le vecteur d'ADN est un plasmide fonctionnel dans des cellules humaines.

20 21. Procédé selon l'une des revendications 4 à 20, caractérisé en ce que le vecteur d'ADN est un ADN linéaire double brin.

22. Procédé selon l'une des revendications 4 à 21 caractérisé en ce que les cellules transfectées à l'étape b) consistent en des cellules bactériennes.

25 23. Procédé selon l'une des revendications 4 à 21, caractérisé en ce que les cellules transfectées à l'étape b) consistent en des cellules de mammifère non humain.

24. Procédé selon l'une des revendications 4 à 21, caractérisé en ce que les cellules transfectées à l'étape b) consistent en des cellules
30 humaines.

1/3

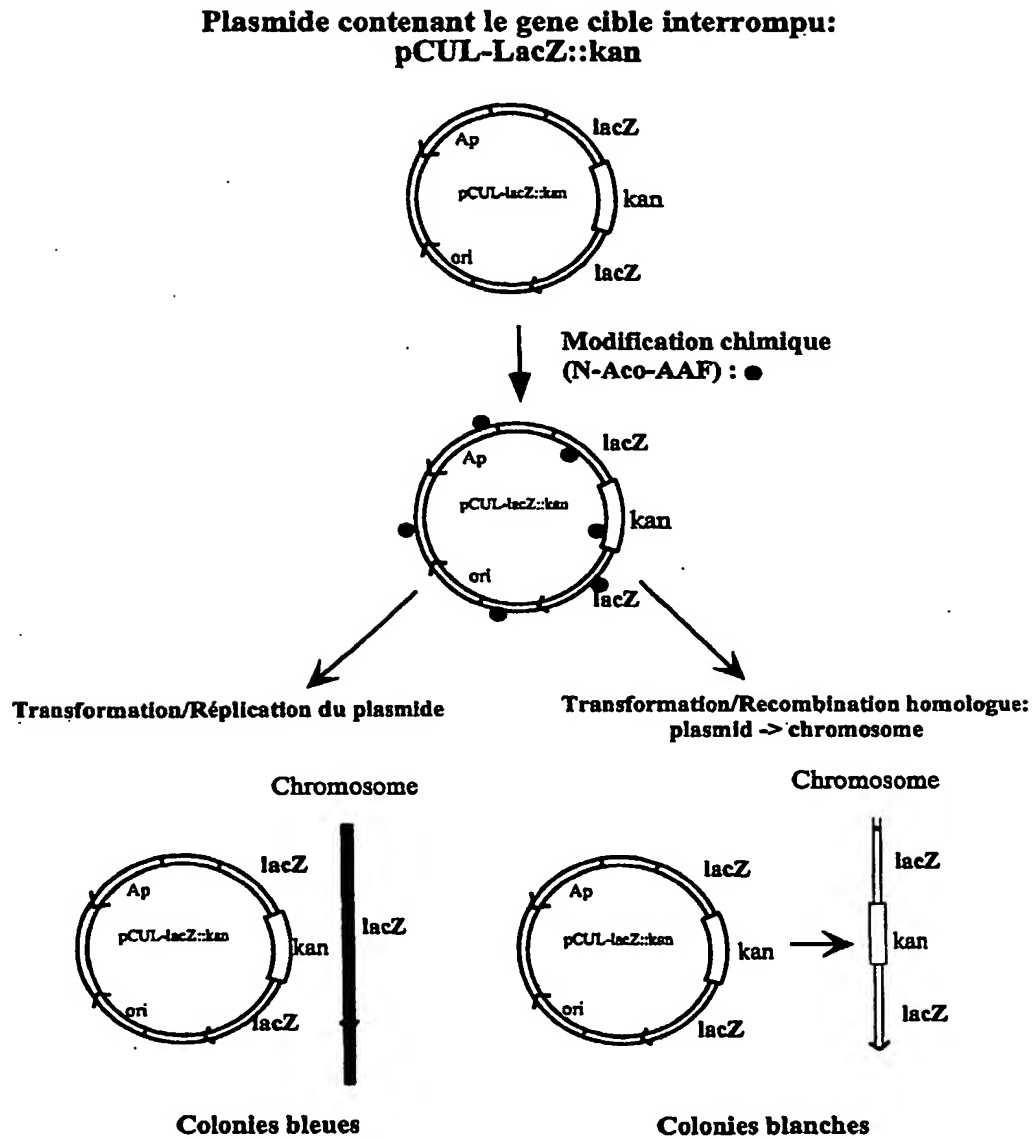
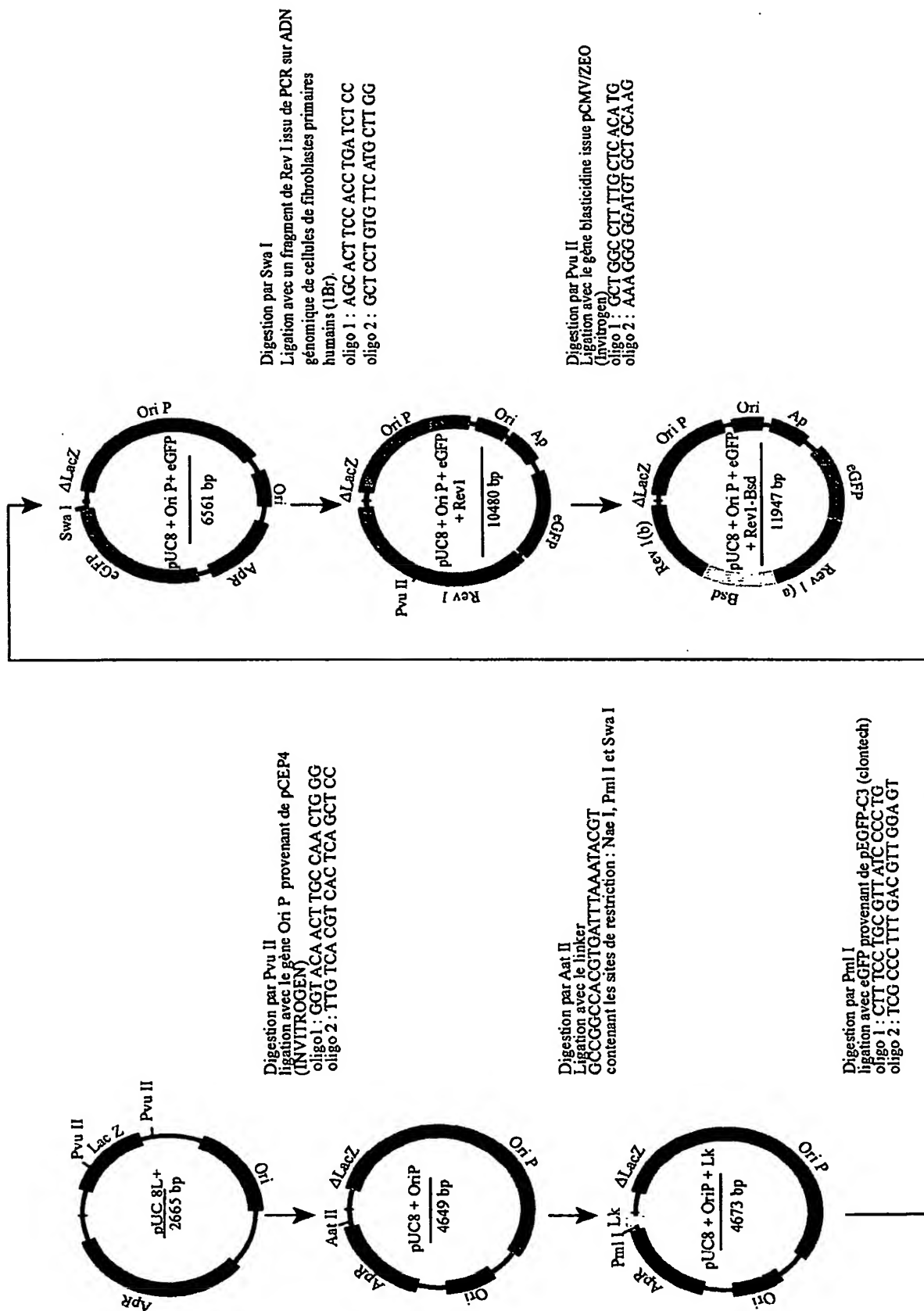


FIGURE 1

2/3



3/3

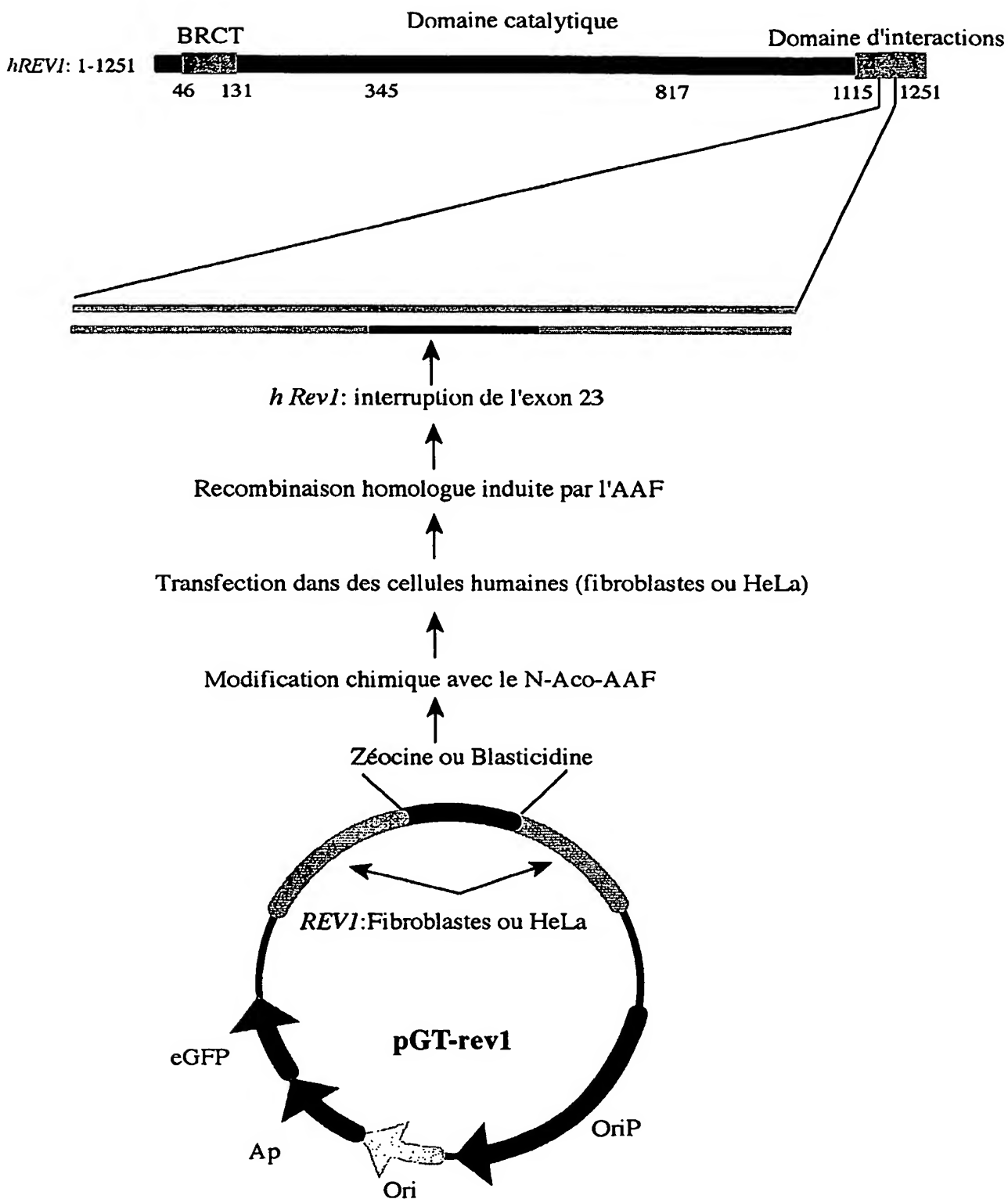


FIGURE 3

1/3
LISTE DE SEQUENCES

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> Procédé pour insérer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule procaryote ou eucaryote par recombinaison homologue.

<130> N771PCT-CNRS

<140>

<141>

<150> FR02134174

<151> 2002-10-28

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 1

ggtacaactt gccaaactggg

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 2

ttgtcacgtc actcagctcc

20

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 3

gccggccacg tgatttaaatacgt

24

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 4

ctttcctgcg ttatcccctg

20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5

tcgccctttg acgttgagat

20

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 6

agcacttcca cctgatctcc

20

<210> 7

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 7

gctcctgtgt tcttcagtct tgg

23

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 8

gctggccttt tgctcacatg

20

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 9

aaaggggat gtgctgcaag

20